

F-6 アジアオセアニア地域における生物多様性の減少解決のための世界分類学イニシアティブに関する研究

(1)GTI地域プログラムの基本プロジェクト開発における分類学的側面に関する研究

⑥インドネシア・タイにおける微細藻類生息環境に関する研究

EFフェロー

Mary-Helene Noel

独立行政法人国立環境研究所

生物圏環境研究領域系統・多様性研究室

笠井文絵・河地正伸

生物圏環境研究領域長

渡辺 信

<研究協力者>

タイ カセサート大学

W. Yongmanitchai

Y. Paopun

D. Chonudomkul

平成14～16年度合計予算額 4, 838千円
(うち、平成16年度予算額 ※2, 419千円)

「※上記の予算額には、間接経費559千円を含む」

[要旨] アジアオセアニア地域では、自然環境の開発が急激に進行し、生物多様性の減少が深刻な問題となっていることから、生物種インベントリーの整備が必要とされている。本研究では、多様性および分類学情報の不足が最も深刻であると指摘されている微生物、特に微細藻類について種多様性と生息環境に関する観測データの収集を行うことを目的として、サンプリング、細胞計数、出現種の観察にいたる方法論の確立、および種の出現頻度と環境要因の比較研究を行った。これまでの底生藻類に関する研究は、ほとんどが基礎生産に関するもので、しかも珪藻以外の分類群は無視されてきた。これは、その他の底生藻類を対象とする調査の困難さの問題があったためだが、多様性研究の面からは、その他の分類群の調査も重要であるため、本研究では、珪藻以外の底生藻類の種組成観察のための方法論を確立することを目的とした。タイ南西部のアンダマン海沿岸に位置するラノンマングローブ林において、6地点26サンプルを採集し、集積培養後に底生藻類の組成を調べた結果、珪藻を除いても、69種類を上回る属/種を含む多様性の非常に高い藻類相であることがわかった。底生藻類の種組成、細胞数、および多様性指数はマイクロハビタットごとに異なり、一定の傾向が示されなかったが、これはマングローブ林に生息する藻類が、この特にストレスが多い生態系において生き残る手段を発達させているためであると考えられた。また、本研究において非常に多数の珪藻以外の種が検出されたことから、本研究で用いられた方法論は、底生藻類の多様性調査に有効な手段であることが示された。

[キーワード] 環境要因、多様性測定、微細藻類、マイクロハビタット、マングローブ

1. はじめに

アジアオセアニア地域では、自然環境の開発が急激に進行し、生物多様性の減少が深刻な問題となっていることから、生物種インベントリーの整備が必要とされている。平成14年度より始まった親研究課題のもとで進行中のサブテーマ「GTI地域プログラムの基本プロジェクト開発における分類学的側面に関する研究」では、インドネシアとタイにおける多様な生物群、多様な生息環境を対象として生物種インベントリーの整備、分類学に関わる知識と技術の共有、人材育成等のキャパシティビルディングが進められている。本研究課題では、多様性および分類学情報の不足が最も深刻であると指摘された微生物、特に微細藻類について種多様性と生息環境に関する観測データの収集を行い、種の出現頻度と環境要因の比較研究を行うことを目的とする。

アジアのほとんどのマングローブ林がそうであるように、ラノンマングローブ林は、木材と木炭、錫採鉱、漁業、貝漁、およびエビ養殖のために利用されてきた^{1), 2)}。人口の増加や都市化はこのようなマングローブ林や沿岸干潟の富栄養化や堆積物の増加を招き、底生藻類の生息場を破壊してきた。現在は、永続的に利用しながら保全する対策が講じられようとしているが、そのためにはこのような場に生息する生物や、環境変動に対する生物の反応を理解することが必要となる³⁾。

これまでのマングローブ生態系における多様性研究は甲殻類や貝類等のマクロファウナに基づいて行われおり、タイのマングローブにおける微細藻類については数編の報告があるのみである^{4) - 5)}。また、多くのマングローブや沿岸干潟における報告では基礎生産や珪藻のみが扱われており、その他の藻類についてはほとんど記載されていない^{6) - 8)}。従って、マングローブ生態系における微細藻類の貢献度を評価するためには、珪藻以外の種に関する知見を集積することが必須であると考えられる。また、プランクトンと異なり、底生藻類は比較的狭い範囲でも、マイクロハビタットにパッチ状に生息し、従来の生態調査で行われてきた定量的ではあるが画一的な調査では多様性が過小評価される可能性があった。したがって、マングローブ生態系における多様性調査では、それぞれのマイクロハビタットに生息する底生藻類の種構成を調べる方法論の確立も必要となる。

ラノンマングローブ林地帯は、タイ政府とUNESCOによって1997年にラノン生物圏保護区に指定されて以来、回復プログラムによって保護されている。また、タイ南部アンダマン海に面し、同じ気候、同じ水系のもとに3つの異なるタイプのマングローブ域が存在する。すなわち、自然林地帯、人為的かく乱のあった地域、回復中の地域であり、微細藻類の多様性を調査するのに理想的な場所といえる（図1）。

2. 研究目的

本研究では、ラノンマングローブ域において、珪藻以外の微細藻類多様性の実態を明らかにし、生息環境との関係を解明するため、サンプル採取法、解析法などの方法論を確立すること、およびその方法を用いて現地調査を行い、種多様性と生息環境に関する観測データを収集し、種の出現頻度と環境要因の比較研究を行うことを目的とする。

3. 研究方法

(1) 調査エリア

ラノンマングローブ林生物圏保護区はタイの南西部のアンダマン海沿岸に位置している(北緯9°43'から9°57'、東経98°29'から東経98°39')。このマングローブ林はタイに残っている中では最大のマングローブ林である。ラノンでは、錫採掘が1985年に禁止されて、主にマングローブの苗木の植林による回復が試みられている^{1),2)}。ラノンでは、一部のエビ養殖が1988年に禁止されて、1994年には木炭用木材の伐採が禁止された。

さまざまなタイプのマングローブ林を把握するために、淡水の上流から水路の河口までをサンプル採集場所として決定した(図1および表2)。サイト2として、「淡水-低塩エリア」を代表する場所としてサンプル採集ルート水路の起点を選んだ。サイト5は錫廃坑の位置にあたり、10~15年前から植林が行われている。サイト6は木炭用木材の伐採地にあたり、植林が行われたのはサンプル採集のわずか3年前であった。サイト1はサイト6に近いのだが、先に回復していて、20年超の樹齢の木がある。最後に、サイト3とサイト4は水路の河口にある干潟であり、「海に面するエリア」を代表する場所である。

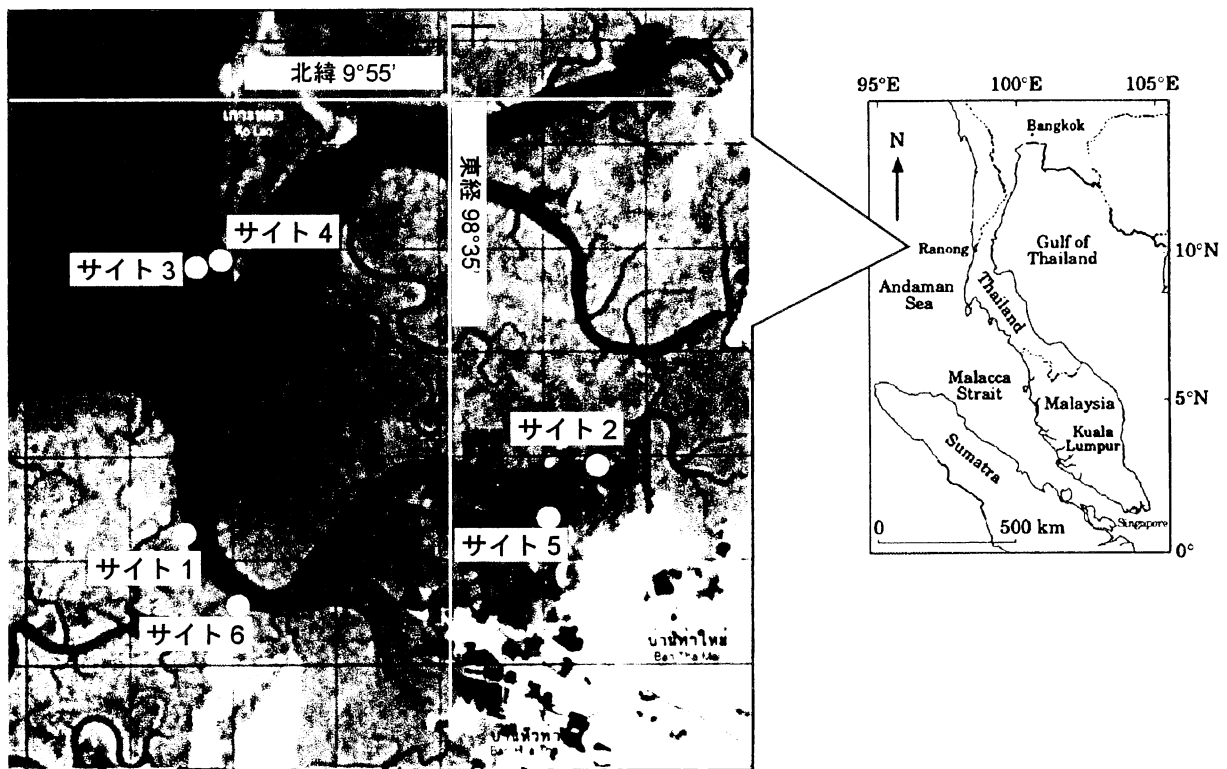


図1. タイ南部、ラノンマングローブ調査地点。調査地点の詳細は表2参照。

(2) サンプルの採集と処理

底生微細藻類を得るために、プラスチック製のヘラを使って堆積物または木の根の薄い表層を採集して、ラベルを貼った50 mLのプラスチックボトルに入れた。表層を採集した後、堆積物を

掘って隙間の水を汲みだした。この単純な方法では水を汲みだせなかったときには、同じサイトの水路の水をボトルに入れた。

キャリブレーション済みの多目的探査デバイス (YSI-556MPS Nanotech、川崎、日本) を使って塩分濃度、pH、溶存酸素量 (DO)、および温度を測定した。2種類の栄養塩測定キットを現地で使用して、栄養塩の範囲を評価した。日本製のキット (Pack-Test, Kyoritsu Chemical-Check Lab., Corp.、東京、日本) を使って NO_2 、 NO_3 、 NH_4 、および PO_4 を測定し、全窒素と全リンの測定には専用のタイ製キット (Aquaculture kit、バンコク、タイ) を使用した。

全サンプルの採集は満潮前に終了した。グルタルアルデヒドを使った固定と集積培養のためにサンプルを採集日当日に小分けにした。2種類の培養液、すなわち、ESM培養液¹⁰⁾と塩分濃度が10‰の汽水用ESM培養液による96穴培養プレートを用意した。両方の培養液にゲルマニウム (GeO_2 , 1 mg/L) を加えて、珪藻が他の微細藻類を圧倒して成長するのを防いだ。ここで得られた藻類の分類学的研究を進めるにあたり、固定サンプルを用いる方法と培養株を用いる方法の両者を用いた。サンプルによっては、細胞密度が希薄な場合があり、プランクトンネット (40 μm 孔径) や0.4-1.0 μm 孔径ポリカーボネートフィルターによる濾過濃縮作業を行い、観察や培養試料に供した。固定サンプルとして、グルタルアルデヒド (適時、カコジル酸ナトリウムバッファーや浸透圧調整のためのシュクロースを添加) による化学固定を行った (最終濃度2.5%)。また走査型電子顕微鏡用の試料として、1mm孔径のポリカーボネートフィルターにより、サンプルを濾過、洗浄の上、乾燥したフィルターサンプルを作成した。

クローン培養株を確立するためには、顕微鏡下で1細胞ずつ分離した。また、海水サンプル用にはESM培地等3種類の培地、淡水サンプル用にはC培地等7種類の培地を用いて、20°C、約2000 luxの照度、12時間明期・12時間暗期の条件下で集積培養を行い、増殖した細胞を分離した。

増殖後の微細藻類の最確数 (MPN) を推定するために希釈係数が1/10、1/100、および1/1000の培養プレートを用意した。サンプル採集の10日後に同様の培養液、すなわち、ESM- GeO_2 とESM- GeO_2 -10‰を用いて、元の表層堆積物サンプルから24穴培養プレートの集積培養セットを日本で新たに用意した。

22°C、20 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 、10時間/14時間の明/暗のサイクルで2ないし3週間培養した後、デジタルカメラ付きのバックライト顕微鏡、オリンパスIMT-2で微細藻類を調べた。マイクロピペットで徹底的に分離して130超の株を得た。

(3) 同定

これらの微細藻類培養株を用いて、光学顕微鏡による外部形態の観察を行い、種の同定を行った。また、走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡を用いて詳細な外部形態の観察や微細構造の解析を行った。さらに、一部の藻類について、分子系統解析を行った。

4. 結果・考察

(1) 底生藻類多様性解析の方法

① 調査地の選定

水路の両岸が日照や他のパラメータによって環境が非常に異なる場合は、水路の両岸からサンプルを採取する必要がある。一般にサンプルは、少なくとも水路の上流部、海水と淡水の混合域、河口部といった3ヶ所から採取する。更に、一般的な場所の他に既開発地、養殖池、修復地などの特異な場所からも採取する。

② サンプリング

各々の調査地において、乾燥地、湿潤地、植物に着生、日照の違う場所などから、少なくとも4サンプルを採取する。表層堆積物に生息する底生藻類との比較のために、水路に生息する微細藻類を採集するとより情報が増す。従って、サンプル数は表層堆積サンプル4と水路の水サンプル1となる。

サンプリングの詳細を図2に示した。泥の表面0.5mmをプラスチック製へらでかき取る。このうち5 mL相当分を洗浄済100 mLボトルに入れる。図2に示したようにボトルのキャップなどを利用して、常に同量を採取するように心がける。ある種の鞭毛藻は付着している化学物質などに弱いため、新しいプラスチック製品を使用する場合は、前もって洗浄しておく必要がある。

間隙水や水溜りがある場合は、採取した泥とともに50 mLになるように水を加える。水を加えることによって藻体をよい状態のまま観察することができ、また、サンプル処理の段階で希釈が必要となるためである。乾燥サンプルの場合、つまり間隙水が取れなかったり、近くに水溜りがなかったりした場合は水路の水を利用する。しかし、この場合は水路の水に存在する微細藻類の混入を防ぐために濾過が必要である。ろ紙によるろ過では比較的大きな粒子が除去され、その後孔径0.2 μm フィルターを装着した50 mLシリンジにより濾過する。このろ過水を泥サンプルに加える。

栄養塩や金属濃度を測定する場合は、最初にろ過したろ液を用いることができる。また、各々のサンプルについて、これらの水を利用して、現場でポータブル水質計を用いて水温、pH、塩分濃度を測定する。採取したサンプルは全て採取後すぐにクーラーボックスに保存する。

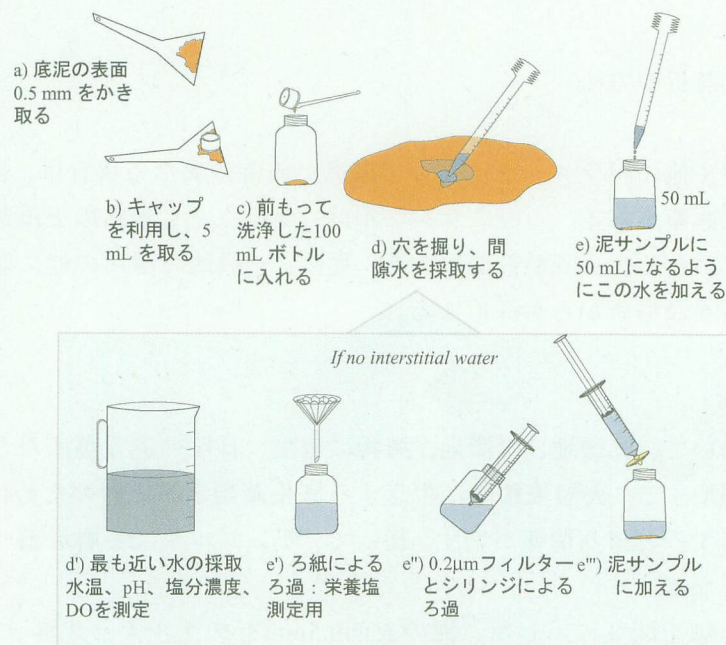


図2. 底生藻類のサンプリング法。詳細は本文を参照。

③ サンプル処理

各サンプルを均質になるようにかく拌し、96穴培養プレートに分注する。これにグルタールアルデヒド（最終濃度1-2%）を加えて固定する。生サンプルを固定せずに観察することが望ましいが、その時間がない場合、固定を行う。ポリカーボネートフィルター上に濃縮しておくと、珪藻を同定するための走査型電子顕微鏡用試料に供することができる。一連の希釈を行い、集積培養用の培養プレート（ESM培地、ESM-10%培地、C培地にGeO₂を最終濃度が1mg/Lになるよう加えた培地）に加える。

各々のサンプルを均質になるように攪拌し、1 mLを9 mL培地を入れた試験管に加え1/10希釈液を作る。この要領で次々に1/100、1/1000希釈液を作る。各々の希釈液から500 μ L を取り、培養プレートのウェルに分注する。この操作を3種の培地について行う。1つのプレートには1つの培地を用いることを推奨する。48穴培養プレートを使用する場合、1希釈あたり6穴を使い、それを3段階の希釈について行う。このような一連の作業を3つの培地のそれぞれについて行い、「最確数法」の希釈と集積培養を同時に行う。培養プレートは96穴も使用することができる。また、サンプル採取直後でなく、2週間程度経過した後、同様の操作を行うことにより、採取直後には見られなかった種を検出することができる。

培養プレートは22-25°C、20 μ E/m²/sec、10/14 hr明暗周期で培養する。

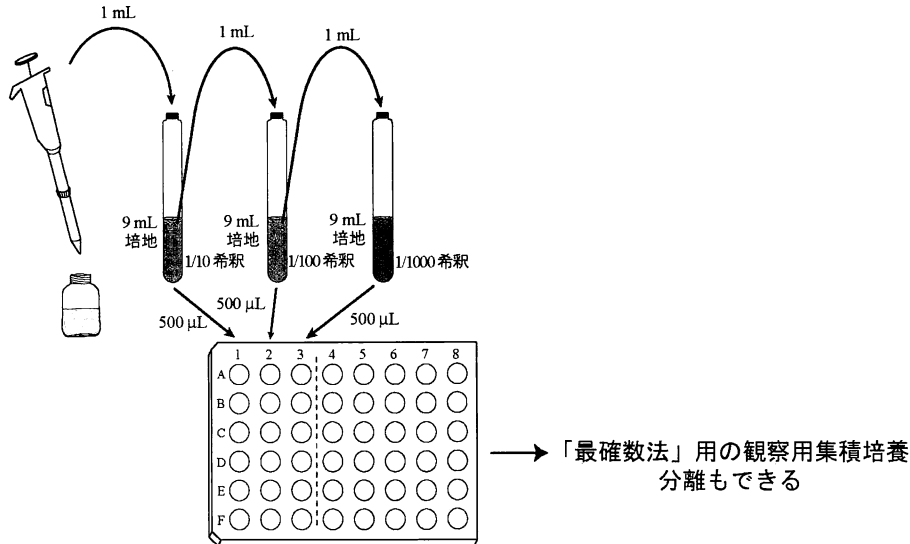


図3. サンプルの希釈と集積培養のための植付け。詳細は本文参照。

④ 観察

固定サンプルは比較的大きなサイズの藻類の観察に用いられる。集積培養した藻類は、倒立顕微鏡を用いて培養プレートのまま観察する。フィルター上に集めたサンプルは、適当な処理を施した後、走査型電子顕微鏡で観察することにより、光学顕微鏡では観察できなかった種の観察が可能になる。

2-3週間培養した後、培養プレートを倒立顕微鏡で観察し、観察できた微細藻類種をそれぞれの穴についてメモする。「最確数法」はこのデータをもとに計算する。

1つの希釈について6ウェルあり、それがそれぞれ3種の培地についてある。従って、1つのサンプルに付54のウェルを観察することになる。定量的な解析が必要ない場合は、単にある種の有無を記録すればよい。また、一度出現したことを記録すれば、その後はその種は観察する必要はない。このようにして、体系的に54のウェル全てについて観察する。

顕微鏡による観察だけでは種までの同定が難しい場合が多いので、特にターゲットにしている種や重要と思われる種については分離培養することが望ましい。状態のよい細胞を分離した方が、その後の経過がよいこと、採集後時間が経過するに従ってバクテリアが増殖し、純粋培養が得られにくいことから、分離は、サンプリング後、なるべく速やかに行うことが望ましい。また、集積培養と同じ培地を用いることにより、確実に分離することができる。ただし、長期間培養株を保存する場合には別の培地の方がいい場合もある。

⑤ 最確数法

最確数は、培養プレートにおける分類群の有無の観察データをもとに、“MPN calculator”¹¹⁾あるいは適当は統計表を用いて計算する。まず、底生藻類の有無データを、それぞれの分類群ごとにまとめる(表1)。それぞれの希釈である種が存在した数から最確数と95%信頼限界を計算することができる。この計算を3種の培地について行い、最も高い値をその種の細胞数とする。この情報は、また、最適な培地がどれか示唆してくれる。また、計算値は1 mL

あたりの細胞数で表されるが、元の泥中の細胞数を算出するには、最確数のための希釈までにどれだけ希釈されているかも考慮しなければならない。表1の例を用いて“MPN calculator”により細胞数を計算すると種Aは240(C. L. = 98-580)細胞/mL、種Bは100(40-270)細胞/mL、種Cは67(22-200)細胞/mLとなる

表1. 最確数を計算するためのまとめ表

分類群	培養プレートのウェル	1/100希釈*	1/1000希釈	1/10000希釈
種 A	1	+	-	-
	2	+	+	-
	3	-	+	-
	4	+	+	+
	5	-	-	-
	6	+	-	+
	存在したウェルの数		4	3
種 B	1	+	+	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	+	-	-
	5	-	-	-
	6	+	+	-
	存在したウェルの数		3	2
種 C	1	-	-	-
	2	-	+	+
	3	+	+	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
	6	-	-	-
	存在したウェルの数		1	2

*サンプル採取時の希釈も含めた希釈

⑥ 培養株の確立

集積培養によって増殖した種は、倒立顕微鏡下でピペット洗浄法により、極細キャピラリーを用いて、培養プレートから直接分離することができる。これには熟練した技術が必要なため、多様性モニタリングの汎用法としては不適切だが、一度このような作業を行って、マングローブの底生微細藻類のインベントリーを作っておくと、次には分離まで行わなくてもその情報を参照して同定することが可能となるため、資源国の分類学者に移転すべき分類技術の1つといえる。

(2) 多様性調査の実施

① 調査地の環境条件

ラノンマングローブは、自然林、回復した成熟林、復元中の背の低い木からなる地域、人為的かく乱が影響を及ぼしている地域からなる。これらのマングローブ域のほか、海に面した砂州状の地点、水路上流部の泥の砂州状地点をマングローブと比較するための対照の調査地点とした(表2)。

表2. ラノンマングローブの調査地点とその環境。マングローブではない地点をそれぞれ汽水および海水地域の対照地点とし、網掛けで示した。

	水路↑流					海側
地点	Site 2	Site 5	Site 6	Site 1	Site 4	Site 3
位置	N 9°52'46" E 98°35'40"	N 9°52'36" E 98°35'18"	N 9°52'02" E 98°33'52"	N 9°52'12" E 98°33'28"	N 9°53'45" E 98°33'31"	N 9°53'42" E 98°33'25"
類型	汽水の対照	マングローブ			干潟 + マングローブ	海水の対照
塩分濃度	12 ‰	12 ‰	18-23 ‰	18-20 ‰	18-24 ‰	24 ‰
生息場の状況	部分的に成熟林、泥の砂州状部分と若木林の境界部から採取	10-15年経過、植林の失敗のため異なる樹令の木々、苗木床	3年経過、1.2 m以下の若木、日射強く乾いた土壌、淡水に特有の植生	15-20年経過、密、木陰、気根が高い位置まであり	自然林と干潟	植生なし
水質	pH=7.0 NH ₄ ⁺ =0.4 PO ₄ ³⁻ =0.1	pH=7.3 NH ₄ ⁺ =0.4 PO ₄ ³⁻ =0.1	pH=6.8-7.6 NH ₄ ⁺ =0.2 PO ₄ ³⁻ =0.2	pH=6.6-7.8 NH ₄ ⁺ =0.2 PO ₄ ³⁻ =0.2	pH=7.2-8 NH ₄ ⁺ =0.2-0.4 PO ₄ ³⁻ =0.1-0.5	pH=7.5 NH ₄ ⁺ =0.5 PO ₄ ³⁻ =0.2
土質	微細な明るい茶色の粘土質	砂質、水面に油膜、泥エビによる小丘	乾燥気味の明るい色の粘土質、泥エビによる小丘	暗色の粘土質、無酸素層	粘土質の干潟、砂と貝殻片	大粒砂質土、貝殻片
潮の影響	引き潮のときのみ出現	大潮のときのみ水没、数の水路と水溜り	平均の満ち潮レベルより高い	満ち潮のとき根が水没、内陸10 mまで海水侵入	林はめったに水没しないところから出現、干潟は満ち潮ごとに水没	引き潮のときのみ出現
サンプル数	2	6	5	5	7	1

② 底生微細藻類の組成

サンプル採集日当日に倒立顕微鏡を使用してサンプルを直接観察したところ、主に珪藻、一部に鞭毛藻の細胞が見られた。しかし、GeO₂を加えた培養液では、多様な属/種の微細藻類が存在することがわかった。底生微細藻類相は、珪藻以外に、20種のシアノバクテリア、18種の緑色植物 (Chlorophyta)、8種のハプト植物 (Haptophyta)、6種の不等毛植物 (Heterokontophyta)、5種の紅色植物 (Rhodophyta)、4種のクリプト植物 (Cryptophyta)、2種の渦鞭毛植物 (Dinophyta)、および茶色のピコプランクトン (brown picoplankton) から構成されていた (表2)。微細藻類のすべてにおいて培養プレートの直接観察からは属レベルまでは確認できなかったが、クローン培養を確立すると、その後の確認が可能になった。

2種類の培養液を用いた集積培養の後に出現した底生微細藻類相は、サンプル採集エリアが高い多様性を持つことを証明した。他のマングローブ林と比べると、ラノンマングローブ生物圏保護区は底生微細藻類の多様性が高く、(珪藻以外では) シアノバクテリアと緑色植物が優勢であるが渦鞭毛藻の存在量は低いようである。渦鞭毛藻の仲間がほとんど存在しないのがラノンの底生微細藻類相の顕著な特徴であると考えられる。渦鞭毛藻は他のマングローブ林、すなわち、インドのマングローブ林¹²⁾、タイの他のマングローブ林^{5), 13), 14)}、およびインドネシアのマングローブ林¹⁵⁾においては多様とされている。しかし、ラノンでは、Trebouxiophyceae、Ulvophyceae、Mesostigmatophyceae、Pedinophyceae、Eustigmatophyceae、

Raphidophyceae、Xanthophyceae、Dictyochophyceaeの各綱が見られたにもかかわらず、これまで調査された他のマングローブ林には存在しないようであった。集積培養法は微細藻類相の研究ではまだ一般的ではないので、存在量の少ない細胞はたいてい見落とされ、全体の多様性が過小評価される。これがおそらく、他の調査では記録されなかったいくつかの綱を我々が発見できた理由であると思われる。

表2. 濃縮術によって発見されたラノンマングローブ森林生物圏保護区の底生微細藻類の一覧

門	綱、目	属 (または説明)
シアノバクテリア	Oscillatoriales	茶色細長細胞、緑色細長細胞、ピンク凝集体、立方体配列の茶色細胞、新たな属か? <i>Arthrospira</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i>
	Chroococcales	<i>Merismopedia</i> , <i>Cyanothece</i> , <i>Synechococcus</i> または <i>Cyanothece</i> または <i>Synechocystis</i> , <i>Eucapsis</i> , <i>Synechococcus</i> 様深緑色凝集、 <i>Synechococcus</i>
	Nostocales	<i>Pseudoanabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Nostoc</i> または <i>Pseudoanabaena</i>
	Pleurocapsales	<i>Dermocarpa</i> Chroococcidiaceae, <i>Myxosarcina</i>
緑色植物門	Chlorophyceae	Chlamydomonadales, <i>Chlamydomonas</i> Sphaeroplales, <i>Ankistrodesmus</i> Chlorococcales, <i>Kirchneriella</i> <i>Characium</i> Chlorococcales, <i>Neospongiococcum</i> Chlorococcales, <i>Apodochloris</i> <i>Graesiella</i> (または Trebouxiophyceae クロレラ)
	Prasinophyceae	<i>Nephroselmis</i> 種 (3種類), <i>Pycnococcus</i> Chlorodendrales, <i>Tetraselmis</i> Pyramimonadales, Pyramimonaceae, <i>Pyramimonas</i>
	Ulvophyceae	Ulotrichales; <i>Ulothrix</i> ; <i>Pseudopleurococcus</i>
	Trebouxiophyceae	<i>Oocystis</i> , クロレラ類似種 (3種類)
	Mesostigmatophyceae	Infra div Streptophyta, Mesostigmatophyceae, <i>Mesostigma</i>
	Pedinophyceae	Pedinomonadales, <i>Pedinomonas</i>
	ハプト植物門	Prymnesiophyceae
Pavlovophyceae		Pavloales, Pavlovaceae, パプロワ
不等毛植物門	Chrysophyceae	Chrysophyceae 種, Hibberdiales, <i>Chrysocapsa</i>
	Raphidophyceae	<i>Heterosigma</i>
	Dictyochophyceae	Ciliophryales, <i>Ciliophrys</i>
	Xanthophyceae	Botrydiales, <i>Botrydiopsis</i>
紅色植物門	Eustigmatophyceae	Eustigmataceae, <i>Monodopsis</i>
	Bangiophyceae	Porphyridiales, <i>Porphyridium</i> , <i>Rhodella</i> ; <i>Rhodorus</i>
	Cyanidiophyceae	Cyanidiales, <i>Cyanidium</i>
クリプト植物門	Cryptophyceae	Goniomonadales, <i>Cyathomona</i> , <i>Cryptomonas</i>
	Hemiselmidaceae	<i>Rhodomonas</i> <i>Hemiselmis</i>
渦鞭毛植物門	Gymnodiniales	<i>Gymnodinium</i> , <i>Amphidinium</i>
未知	未知	茶色ピコプランクトン

表 3. 代表度と相対存在量（存在率）によりランク付けしたラノンマングローブ生活圏保護区の底生微細藻類

底生微細藻類	26 サンプル中の存在率 (%)	総細胞数に占める割合 (%)
Chlorophyta, <i>Ankistrodesmus</i>	4	< 0.1
Chlorophyta, <i>Chlamydomonas</i>	4	< 0.1
Chlorophyta, <i>Nephroselmis</i>	4	< 0.1
Cyanophyta, <i>Merismopedia</i>	4	< 0.1
Heterokontophyta, Chrysophyceae	4	< 0.1
Chlorophyta, <i>Oocystis</i>	8	< 0.1
Chlorophyta, <i>Tetraselmis</i>	8	< 0.1
Chlorophyta, <i>Apodochloris</i>	8	0.2
Cryptophyta, <i>Cyathomonas</i> = <i>Goniomonas</i>	8	< 0.1
Cyanophyta, <i>Arthrospira</i>	8	< 0.1
Cyanophyta, 立方体構造の茶色細胞	8	< 0.1
Dinophyta, <i>Gymnodinium</i>	8	< 0.1
Chlorophyta, <i>Nephroselmis</i> の種 1 および種 2	12	< 0.1
Chlorophyta, クロレラ	12	0.3
Cyanophyta, <i>Pseudoanabaena</i>	12	< 0.1
Cyanophyta, <i>Cyanothece</i>	12	0.1
Heterokontophyta, <i>Chrysocapsa</i>	12	0.1
Chlorophyta, <i>Mesostigma</i>	15	0.2
Chlorophyta, <i>Pyramimonas</i>	15	0.3
Chlorophyta, <i>Neosporangiococcum</i>	15	0.2
Cyanophyta, <i>Synechococcus</i> または <i>Cyanothece</i>	15	0.2
Haptophyta, <i>Platyochrysis</i> または <i>Prymnesium</i>	15	1.4
Rhodophyta, <i>Cyanidium</i>	15	0.9
Chlorophyta, <i>Pedinomonas</i>	19	0.2
Haptophyta, 底生生活期、および糸状体	19	0.3
Heterokontophyta, <i>Heterosigma</i>	19	0.2
Rhodophyta, <i>Porphyridium</i>	19	0.2
Chlorophyta, <i>Kirchneriella</i>	23	0.3
Haptophyta, 底生生活期、渦鞭毛細胞	20	0.3
Cyanophyta, <i>Lyngbya</i>	23	0.2
Cyanophyta, <i>Nostoc</i> または <i>Pseudoanabaena</i>	25	0.3
Cryptophyta, <i>Hemiselmis</i>	27	0.9
Cyanophyta, 新種の属か?	27	0.6
Heterokontophyta, <i>Monodopsis</i>	28	0.3
Chlorophyta, <i>Ultrichales</i>	31	0.4
Dinophyta, <i>Amphidinium</i>	31	0.2
Haptophyta, 底生生活期の立方体コロニー	31	0.4
Haptophyta, 底生生活期、濃い粘液	32	0.6
Haptophyta, <i>Platyochrysis</i>	35	0.53
Cyanophyta, <i>Anabaenopsis</i>	38	0.3
Heterokontophyta, <i>Botrydiopsis</i>	38	0.5
Cyanophyta, <i>Myxosarcina</i>	40	0.8
Chlorophyta, <i>Ulothrix</i>	42	0.5
Cyanophyta, <i>Eucapsis</i>	42	0.5
Heterokontophyta, <i>Ciliophrys</i>	42	0.3
Cryptophyta, <i>Rhodomonas</i>	48	0.9
Chlorophyta, <i>Chlorella</i> spp	54	1.2
Cryptophyta, <i>Cryptomonas</i>	54	0.9
Chlorophyta, <i>Characium</i>	58	0.6
Rhodophyta, <i>Rhodella</i>	58	0.8
Cyanophyta, <i>Oscillatoria</i>	65	1.0
Haptophyta, パプロワ	65	4.3
Rhodophyta, <i>Rhodorus</i>	65	1.2
Rhodophyta, <i>Rhodella</i> 様	77	1.9
Chlorophyta, <i>Pycnococcus</i>	81	2.5
Cyanophyta, <i>Dermocarpa</i>	85	2.
Cyanophyta, <i>Synechococcus</i> 様	85	4.5
茶色ピコプランクトン	85	4.6
Chlorophyta, <i>Pseudopleurococcus</i>	96	4.2
Cyanophyta, <i>Phormidium</i>	100	6.2
Cyanophyta, <i>Synechococcus</i> 種	100	49.0

③ 底生微細藻類の存在量と代表度

検出された微細藻類の属の偏在性または希少性を全サンプル（26サンプル）中の属の存在率により推定した。また、「最確数」の統計表の希釈係数から各サンプルに元来含まれていた細胞数を算定した。細胞数はサンプル採集時の各属の存在量を示し、サンプル採集エリアにおける各属の存在率の計算を可能にする。サンプル採集エリアにおいてもっとも代表的な底生微細藻類（存在率 > 50%）を少ないものから順に挙げると、*Chlorella* spp., *Cryptomonas* sp., *Characium* sp., *Rhodella* sp., *Oscillatoria* sp., *Pavlova* spp., *Rhodella*-様細胞, *Pycnococcus* sp., *Dermocarpa* sp., *Synechococcus*-様細胞, 茶色picoplankton, *Pseudopleurococcus* sp., *Phormidium* sp. および *Synechococcus* spp.となる。すべてのサンプルに*Synechococcus* spp.が見られた（存在率100%）。また、その相対存在量は最大であり、サンプル採集エリアの総細胞数の約50%を占めた。

マングローブ林に関する他の論文には、珪藻以外の微細藻類の主たるものとして渦鞭毛藻とシアノバクテリアが挙げられている¹⁶⁾。ラノン保護区では、珪藻を別にする、シアノバクテリアが優勢であり、存在量はかなり少ないがChlorophyta (Ulvophyceae) とHaptophyta (Pavlovophyceae)、非常に少数のDinophytaがこれに続く。この結果は、用いられた方法論の結果と、あるいは、ラノンマングローブ保護区の実際のパターンと比較する必要がある。しかし、「最確数」のための希釈法と組み合わせた集積培養は多様性と存在量、代表度を評価するのに効果的な方法であると思われる。

④ 底生微細藻類の多様性を調べるための方法論の重要性

我々は、ラノンマングローブにおいてサンプルを採集した直後に用意した96穴培養プレートを集積培養したところ、*Pyramimonas* sp.と*Hemiselmis* sp.を発見して、それらの分離に成功したが、これらの2種はサンプル採集の10日後に用意した培養プレートには存在しなかった。一方、サンプル採集の10日後に用意した培養プレートは*Platychrysis* sp.の生長に適していた。コロニーの識別が容易だったので、これらのプレートから*Platychrysis* sp.を分離することができたが、その存在は1回目の集積培養ほど顕著ではなかった。

集積培養に使用した2種類の培養液の間には違いが見られた。*Kirchneriella*株は、塩分濃度が10‰の汽水性培養液でのみ生長した。ESM-10‰の培養液で分離を行ったところ、この属は淡水種として知られているのに、その細胞は分離を行ってから現在まで維持されている。*Oocystis*属については、細胞が海水性培養液の培養プレートにしか見られなかった。海水性と汽水性の培養液で分離を行った。この淡水性の種は両方の培養液の中で生長できたが、汽水性の培養液での成長のほうが海水性の培養液よりも早かった。もうひとつの淡水属である*Myxosarcina*株は海水性の培養液の培養プレートにのみ見られた。海水性培養液を用いて分離と維持管理を1年以上行ったが、細胞の状態は徐々に劣化した。汽水性培養液に移すと状態が改善されたので、最終的に淡水性培養液に移せば株の状態はさらに良くなるはずである。汽水性培養液に入れた*Hemiselmis*株は1年間培養された後に最終的には死滅した。

ほとんどの植物相研究はサンプル中の微細藻類の直接観察に基づいており、集積培養や最確数法を用いない。しかし、我々は集積培養を用いたため、サンプル採集時に僅かに存在した微細藻類を見つけることができた。培養液の中で増殖できる微細藻類を調べるこの技術の限界は、培養

不能な微細藻類が見落とされることである。我々は、1つが海水性、1つが汽水性の2種類の培養液を選んだが、ほとんどの場合に両方の培養液で多様な微細藻類の増殖を見ることができたので賢明な方法であると考えられた。ただし、事例は少ないものの片方の培養液でしか増殖が見られないケースもあった。サンプル採集の少し後にも集積培養を繰り返したが、さらなる植物相を得るには良い方法であると思われる。この方法を採用した結果、底生微細藻類相が非常に多様であることが示された。

5. 本研究により得られた成果

本研究では、現在最も脆弱だと考えられている東南アジア地域のマングローブ林の底生微細藻類相を調べるための方法論を確立した。特に、これまでマングローブ林を始めとする沿岸干潟の生態系では、優占種とはいえ、ほとんど全てが珪藻の知見であった。しかし、多様性モニタリングでは、食物網で重要な働きをする混合栄養を行うグループなど、他の微細藻類の存在もできるだけ多くの種の存在を知る必要がある。本方法を用いることによって、そのような種の検出が可能になり、珪藻以外の70種あまりの分類群が見出された。

現在の微細藻類分類学では、微小な分類群は、光学顕微鏡レベルの形態観察では種のレベルまで同定できない場合が多い。本研究では、最終的に多くの培養株を確立することができたが、これらの培養株に基づき、分子系統解析を含む更に詳細な分類学的研究を進めることも可能である。このように、サンプリングから集積培養などのサンプル処理、さらに細胞数の推定から同定にいたる方法論は、今後の他の地域の底生微細藻類相モニタリングに大いに活用できると考えられる。

6. 引用文献

- 1) Macintosh, D.J., Ashton, E.C. and Havanon, S. (2002), Mangrove rehabilitation and intertidal biodiversity: a study in the Ranong mangrove ecosystem, Thailand. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55: 331-345.
- 2) Macintosh, D.J., Ashton, E.C. and Tansakul, V. (2002), Utilisation and knowledge of biodiversity in the Ranong Biosphere Reserve, Thailand. *ITCZM Monograph No. 7*. 30pp.
- 3) Crooks, S. and Turner, R. K. (1999) Integrated coastal management: Sustaining estuarine natural resources. *Adv. Ecol. Res.*, 20, 241-289.
- 4) Boonruang, P. (1985) The community structure abundance and distribution of zooplankton on the east coast of Phuket Island Southern Thailand, Andaman Sea. *Phuket Marine Biology Center Research Bulletin* 39:1-13.
- 5) Marumo, R. S. et al. (1985) Plankton and near bottom communities of the mangrove regions in Ao Khung Kraben and the Chantaburi River, Thailand. *Mangrove Estuarine Ecology in Thailand. Thai-Japanese Cooperative Research Project on Mangrove Productivity and Development, 1983-1984*. 55-74.
- 6) Suvapepun, S., Tharnbupha, C. L, and Phiramnim, M. (1980) The relationship between phytoplankton and the environmental conditions at the Ta-Chin Estuary. *Fisheries Gazette* 35 (3):275-294.
- 7) Alongi, D. M. (1994) Zonation and seasonality of benthic primary production and

- community respiration in tropical mangrove forests. *Oecologia*, 98, 320-327.
- 8) Underwood, G. J. C., Phillips, J. and Saunders, K. (1998) Distribution of estuarine benthic diatom species along salinity and nutrient gradients. *Eur. J. Phycol.*, 33, 173-183.
- 9) Underwood, G. J. C. (2002) Adaptations of tropical marine microphytobenthic assemblages along a gradient of light and nutrient availability in Suva Lagoon, Fiji. *Eur. J. Phycol.*, 37, 449-462.
- 1 0) Kasai, F., Kawachi, M., Erata, M. and Watanabe, M. M. (2004) NIES-Collection LIST OF STRAINS Seventh Edition 2004 Microalgae and Protozoa. Pp.257, NIES.
- 1 1) MPN calculator. <http://members.ync.net/mcuriale/mpn/index.html>
- 1 2) Dham, V.V., Heredia, A.M., Wafar, S. and Wafar, M. (2002) Seasonal variation in uptake and in situ regeneration of nitrogen in mangrove waters. *Limnol. Oceanogr.* 47-1: 241-254.
- 1 3) Sundström, B., Janekarn, V., Hylleberg, J. and Boonruang, P. (1987), Annual pelagic primary production with notes on physical and chemical variables at Phuket, the Andaman Sea, Thailand. Phuket Marine Biological Center, Res. Bull. No. 46. 18pp.
- 1 4) NMC and NRC, (1991), Integrated multidisciplinary survey and research programme of the Ranong mangrove ecosystem. UNDP/UNESCO RAS/86/120. Bangkok. 183pp.
- 1 5) Inouye, I. (1988), Microalgae of mangroves and characteristics of the community, In: Biological system of mangroves. A report of East Indonesian mangrove expedition, 1986. Ogino and Chihara Eds. Ehime University. 35-43.
- 1 6) Phung, T.N.H.; Coute, A.; Bourrelly, P. (1992) Cyanophyceae from the Mekong-Delta (Vietnam). *Nova Hedwigia*, 54, 403-446.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表 (学術誌・書籍)

<学術誌 (査読あり)>

なし

<学術誌 (査読なし)>

なし

<書籍>

なし

<報告書類等>

なし

(2) 口頭発表

- ⑨ F. Kasai, M. Kawachi, W. Yongmanitchai, M-H. Noel, J. Shimura & M. M. Watanabe: Joint International forum on Biodiversity Information, Building Capacity in Asia and Oceania, Tsukuba, 2003. "Taxonomic studies of microalgae in freshwater wetland and coastal region

of Thailand: Taxonomic capacity building for conservation of microbial diversity.”

- ⑩ 河地正伸、M-H. Noel、W. Yongmanitchai、彼谷邦光、笠井文絵、渡辺信：日本藻類学会第28回大会（2004）「タイ沿岸域におけるハプト藻*Platychrysis*属の多様性」
- ⑪ M-H. Noel, M. Kawachi, W. Yongmanitchai, F. Kasai, M. M. Watanabe: 日本藻類学会第28回大会（2004）“Biodiversity of microalgae in Southern Thailand mangroves.”
- ⑫ M. Kawachi, M-H. Noel, W. Yongmanitchai, K. Kaya, F. Kasai, M. M. Watanabe: 10th International Congress for Culture Collections, Tsukuba, 2004. “Taxonomic study on *Platychrysis* (Haptophyta) in Thailand.”
- ⑬ M-H. Noel, W. Yongmanitchai, M. Kawachi, F. Kasai, M. M. Watanabe: 10th International Congress for Culture Collections, Tsukuba, 2004. “Benthic microalgae cultures obtained from a Southern Thailand mangrove forest”.

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

本研究成果は、多様性条約に基づく世界分類学イニシアティブにおいて、現在その整備がもっとも遅れている微生物分類学の一つのモデルケースとして、東南アジアを含む発展途上国の微細藻類分類学のキャパシティービルディングに貢献する。